

ФОКУСЫ АБЕРРАНТНЫХ КРИПТ И ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА НА ФОНЕ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПЕР- И ГИПОТИРЕОЗА

© С.Н. Прошин¹, Р.А. Курбанов², С.И. Лоскутов³, Н.Н. Барсуков¹, Х.О. Алибеков¹, Д.А. Качанов¹, Р.И. Глушаков⁴, Г.О. Багатурия²

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

³ ООО «НПО «БиоЭкоТех»;

⁴ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург

Для цитирования: Прошин С.Н., Курбанов Р.А., Лоскутов С.И., и др. Фокусы aberrant crypts и изменения микробиоты кишечника на фоне химического мутагенеза и экспериментального гипер- и гипотиреоза // Педиатр. – 2018. – Т. 9. – № 6. – С. 63–72. doi: 10.17816/PED9663-72

Поступила: 04.10.2018

Одобрена: 11.12.2018

Принята к печати: 21.12.2018

В статье представлены данные об индукции метилнитрозомочевинной фокусов aberrant crypts на фоне экспериментально измененного тиреоидного статуса у мышей и сопутствующих изменений микробиоты кишечника. Так как фокусы aberrant crypts служат очевидной предпосылкой для дальнейшей малигнизации в колоректальный рак, то индукция колоректального рака метилнитрозомочевинной является наиболее приемлемой моделью для исследования механизмов канцерогенеза. В работе были использованы мыши-самцы линии BALB/c, которые получали метилнитрозомочевину (МНМ) при сочетанном воздействии L-тироксина или пропилтиоурацила в течение 24 недель. Результаты исследования указывают, что частота возникновения фокусов aberrant crypts (ФАК) была достоверно выше для группы животных, которые получали как МНМ, так и L-тироксин ($38,9 \pm 3,6$ %). При этом частота возникновения ФАК на фоне гипертиреоидного статуса без воздействия МНМ также находилась на высоком уровне ($12,9 \pm 4,2$ %). При этом гипотиреоидный статус оказывал достоверно выраженное защитное влияние на эпителий кишечника при воздействии МНМ ($16,1 \pm 2,5$ %). Обнаружено достоверное количественное снижение *Lactobacillus spp.* как в группах мышей, подвергавшихся воздействию МНМ, так и у животных на фоне гипертиреоидного статуса. Обсуждаются механизмы, способствующие возникновению повышенной частоты ФАК в контексте гипер- и гипотиреоидного статуса. Сделан вывод, что повышенная частота возникновения фокусов aberrant crypts и снижение представителей нормальной микробиоты ассоциированы с гипертиреозом, который модулируется введением метилнитрозомочевины.

Ключевые слова: метилнитрозомочевина; гипер- и гипотиреоз; фокусы aberrant crypts; микробиота кишечника.

THE FOCI OF ABERRANT CRYPTS AND CHANGES OF MICROBIOTA OF GUT UPON CHEMICAL MUTAGENESIS AND EXPERIMENTAL HYPER- AND HYPOTHYROID STATUS

© S.N. Proshin¹, R.A. Kurbanov², S.I. Loskutov³, N.N. Barsukov¹, H.O. Alibekov¹, D.A. Kachanov¹, R.I. Glushakov⁴, G.O. Bagaturiya²

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

² St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia;

³ St. Scientific Production Company "BioEchoTech", Saint Petersburg, Russia;

⁴ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

For citation: Proshin SN, Kurbanov RA, Loskutov SI, et al. The foci of aberrant crypts and changes of microbiota of gut upon chemical mutagenesis and experimental hyper- and hypothyroid status. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2018;9(6):63-72. doi: 10.17816/PED9663-72

Received: 04.10.2018

Revised: 11.12.2018

Accepted: 21.12.2018

In our paper we present data on the induction of nitrosomethylurea focuses of aberrant crypts on experimentally altered thyroid status in mice and concomitant changes in the intestinal microbiota. Since the foci of aberrant crypts are an obvious

prerequisite for long-range malignancy in colorectal cancer, the induction of colorectal cancer induced by nitrosomethylurea is the most appropriate model for investigating mechanisms of carcinogenesis. Male BALB / c male mice which were treated with nitrosomethylurea (NMU) for 24 weeks when also combined with L-thyroxin or propylthiouracil were used in the study. The results indicate that the incidence of aberrant crypt foci (FAC) was significantly higher for a group of animals which were treated with both NMU and L-thyroxin $38.9 \pm 3.6\%$. At the same time the incidence of FAC with hyperthyroid status only without exposure to NMU was also high at $12.9 \pm 4.2\%$. It was shown that the hypothyroid status had a significant protective effect on the intestinal epithelium when exposed to HMN – $16.1 \pm 2.5\%$. A significant quantitative decrease in *Lactobacillus spp.* of microbiome was detected in groups of mice exposed not only to NMU, but also in animals with experimentally induced hyperthyroid status only. Mechanisms that contribute to the occurrence of an increased frequency of FAC in the context of hyper- and hypothyroid status are discussed. It was concluded that an increased incidence of foci of aberrant crypts and a decrease in the quantity of the normal microbiota are associated with hyperthyroid status which modulated upon administration of methylnitrosourea.

Keywords: nitrosomethylurea; hyper- and hypothyroid status; foci of aberrant crypts; microbiota of gut.

АКТУАЛЬНОСТЬ

К настоящему времени индукция рака метилнитрозомочевиной (МНМ) является наиболее приемлемой моделью для исследования механизмов канцерогенеза, особенно рака прямой кишки. Как и при спорадически возникающем колоректальном раке у человека, по результатам экспериментальных исследований на животных можно провести аналогию появления у них в кишечнике морфологических изменений, возникновения фокусов клеточной пролиферации эпителия и даже «клинических» проявлений этого заболевания. Важная особенность МНМ в отличие от азоксиметана заключается в том, что МНМ не подвергается метаболической трансформации, что исключает определенные затруднения в интерпретации получаемых результатов [28]. Стадия возникновения фокусов aberrантных крипт (ФАК) предшествует этапу, на котором воздействие МНМ на кишечный эпителий может быть со всей очевидностью визуализировано гистологически [23]. К настоящему времени доказано, что ФАК, прежде всего на молекулярном уровне, служат предпосылкой для дальнейшей малигнизации в колоректальный рак и/или выступают серьезным фактором риска возникновения рака прямой кишки [29, 31]. К возникновению ФАК могут приводить разнообразные причины: семейный аденоматозный полипоз и наследственный неполипозный полипоз [15, 21], наследственная предрасположенность, то есть колоректальный рак у одного из родителей [16]. Также исследуется взаимосвязь между изменениями и активностью микробиома и его метаболома и возникновением рака прямой кишки [26]. Низкая частота возникновения рака выявлена у пациентов, пораженных гидатидным эхинококкозом [10]. Не регистрируется колоректальный рак у пациентов с американским трипаносомозом [32]. В экспериментальной модели показано, что животные, у которых персистируют такие представители трансмиссивных протозойных

агентов, как *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* и *Plasmodium yoelii*, более устойчивы к опухолевому росту [13, 20, 27]. С другой стороны, имеются данные, указывающие, что пациенты, у которых персистируют *Cryptosporidium spp.*, принадлежащие к группе *Firmicutes*, более подвержены колоректальному раку [34]. Таким образом, очевидно, что микросимбиоз, находясь в тесной взаимосвязи с биотопом организма человека, формирует определенное состояние гомеостаза, зависящее не только от макропартнера, но и, в частности, от качественного и количественного состава микробиоты (эубиоз/дисбиоз). Кишечный дисбиоз способствует развитию, формированию и прогрессированию хронических воспалительных процессов в различных органах, в том числе воспалительных заболеваний в ЖКТ [7]. В настоящее время установлено, что повышенная активность бактерий *Yersinia spp.* из группы *Enterobacteriaceae* и *H. pylori* из группы *Proteobacteria* тесно ассоциирована с патологией щитовидной железы [14]. А это, в свою очередь, может привести к опухолям различных локализаций. Выявлена причинно-следственная связь между изменением состава микробиома у женщин и возникновением у них рака молочной железы [17]. Нанопептиды гипоталамического происхождения, будучи филогенетически более древними, обеспечивают тканям различного генеза реализацию их компенсаторных и приспособительных свойств при разнообразных воздействиях как на макроорганизм, так и на микробиом [9]. Так, например, установлен факт синергидного действия окситоцина с рядом антибактериальных препаратов *in vitro* и при лечении сепсиса у мышей, вызванного бактериями из группы *Actinobacteria* микробиома. К настоящему времени это позволило перейти к клинической апробации сочетанного использования антибиотиков с окситоцином при лечении гнойно-воспалительных заболеваний [33]. Показано, что эрадикационная фармакотерапия *H. pylori*, которая

Таблица 1 / Table 1

Распределение животных по экспериментальным группам и применяемым к ним фармакологическим средствам (веществам)

The distribution of mice is due to experimental groups and administered pharmacological substances

Вещество / Substance	Группа / Groups					
	Первая / 1 st	Вторая / 2 nd	Третья / 3 rd	Четвертая / 4 th	Пятая / 5 th	Шестая / 6 th
–	10	–	–	–	–	–
МНМ / NMU	–	10	–	–	–	–
МНМ + L-тироксин / NMU + L-thyroxin	–	–	20	–	–	–
МНМ + ПТУ / NMU + PTU	–	–	–	20	–	–
L-тироксин / L-thyroxin	–	–	–	–	20	–
ПТУ / PTU	–	–	–	–	–	20

Примечание. МНМ — метилнитрозомочевина; ПТУ — пропилтиоурацил.

Note. The group 1 – control; the group 2 – NMU; the group 3 – NMU + L-thyroxin; the group 4 – NMU + PTU; the group 5 – L-thyroxin; the group 6 – PTU.

принадлежит к группе *Proteobacteria*, более эффективна при сочетании с применением L-тироксина для парентерального введения [30]. Выявлена отрицательная взаимосвязь между уровнем тиреоидных гормонов у новорожденных с сепсисом и летальным исходом, возможно, вследствие того, что микробиом тонкого кишечника может активно влиять на уровень тиреоидных гормонов организма [24, 25].

Целью исследования было оценить влияние экспериментально измененного тиреоидного статуса на формирование ФАК, индуцируемого МНМ, и микробиоту кишечника.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было использовано 100 мышей (♂) линии BALB/c массой 20 г (питомник «Рапполово» Ленинградской области), которых на протяжении эксперимента содержали в стандартных условиях¹.

Животные были поделены на шесть групп (табл. 1). Группу контроля составило десять животных (группа 1); десять животных получали только МНМ (группа 2); 20 животных — МНМ + L-тироксин (группа 3) и 20 животных — МНМ + ПТУ (пропилтиоурацил) (группа 4). Кроме того, были сформированы еще две группы по 20 животных без применения МНМ, одна

из которых получала только L-тироксин (группа 5), а другая — только ПТУ (группа 6). Таким образом, чтобы достичь гипертиреоидного состояния использовали L-тироксин в концентрации 0,01 %, а чтобы достичь гипотиреоидного состояния — ПТУ в концентрации 0,5 %. Оба вещества добавляли в поилки. Для экспозиции животных к МНМ применяли метод ректального введения, при котором с помощью гибкого пластикового зонда МНМ доставляли в прямую кишку в концентрации 0,8 % [8]. Процедуру повторяли 1 раз в неделю в течение четырех недель. Глубина введения ректального зонда составляла около 1 см (рис. 1).



Рис. 1. Введение нитрозометилмочевины ректальным катетером

Fig. 1. Administration of methylnitrosourea by rectal catheter

¹ Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51 (зарегистрировано Министерством юстиции Российской Федерации 31 октября 2014 г., № 34547).

Фокусы аберрантных крипт регистрировали по следующей схеме: животных из всех групп, включая контроль, подвергали цервикальной дислокации на 20-й неделе эксперимента. Далее *ex tempo* выделяли кишечник, промывали фосфатно-солевым буфером ФСБ для освобождения от каловых масс, выделяли прямую кишку с прилежащим участком, вырезали, разрезали продольно и слизистой оболочкой вверх помещали на предметное стекло. Далее наносили 0,2 % раствор метиленового синего, приготовленного на ФСБ, и регистрировали ФАК на световом микроскопе при увеличении $\times 400$ (об. 10, ок. 40). Подсчитывали частоту ФАК для каждого животного и выражали в процентах. Статистическую обработку результатов проводили по *t*-критерию Стьюдента.

Для анализа микробиоты кишечника в начале эксперимента и перед выведением животных из эксперимента от каждой группы животных собирали фекалии, после чего анализировали количественный состав микробиоты. Для выделения ДНК в пробирку объемом 2 мл помещали 0,2 г фекалий. Добавляли равное по объему количество шариков диаметром 0,1 мм (BioSpec, США), 350 мкл раствора А (натрий-фосфатный буфер — 20 мМ, изотиоцианат гуанидина — 240 мМ; pH 7,0), 350 мкл раствора Б (Трис-НСI — 500 мМ, SDS — 1 % по массе к объему; pH 7,0) и 400 мкл смеси фенол-хлороформ. Пробирку помещали в гомогенизатор (Bertin Technologies) и разрушали образец в течение 10–15 мин. Затем центрифугировали при 10 000–15 000 об. в течение 5 мин. Водную фазу отбирали, добавляли 400 мкл хлороформа, интенсивно встряхивали 1–3 мин, центрифугировали так же, как на предыдущей стадии, отбирали водную фазу. К неочищенному экстракту ДНК добавляли один объем изопропилового спирта, интенсивно встряхивали, центрифугировали, промывали 70 % этанолом, слегка подсушивали на воздухе и растворяли осадок при 65 °С в течение 15 мин в 100 мкл воды. Для очистки ДНК от примесей проводили электрофорез в 1 % агарозе (0,5 \times ТАЕ-буфер). Вырезанный блок, содержащий ДНК, помещали в пробирку типа эппендорф (1,5 мл), добавляли два объема раствора В (изотиоцианат гуанидина — 3 М, Трис-НСI — 20 мМ, Тритон X-100 — 20 мг/мл; pH 7,0) и инкубировали при 65 °С до полного растворения блока. К раствору добавляли 20 мкл раствора Г (раствор В с добавлением тонкодисперсной окиси кремния, 40 мг/мл), перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем центрифугировали при

максимальной скорости, полностью убирали супернатант, осадок суспендировали в 200 мкл раствора Д (этанол — 25 %, изопропанол — 25 %, NaCl — 100 мМ, Трис-НСI — 10 мМ; pH 7,0), центрифугировали, полностью отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в этаноле, опять центрифугировали и полностью удаляли супернатант. Осадок подсушивали на воздухе в течение 15 мин, добавляли 50 мкл элюирующего буфера (Трис-НСI — 10 мМ, EDTA — 1 мМ; pH 8,0) и элюировали на вортексе в течение 20–30 мин. После этого образцы центрифугировали и отбирали супернатант, избегая попадания окиси кремния в очищенный препарат ДНК. При конструировании и секвенировании ампликонных библиотек очищенный препарат ДНК (по 10–15 нг) использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР (температурный профиль: 94 °С — 30 с, 56 °С — 30 с, 72 °С — 60 с; всего 25 циклов) с добавлением полимеразы Encyclo («Евроген», Россия) и универсальных праймеров к вариабельному участку гена V3 гена *Lactobacillus* 357f (CCTACGGGAGGCAAGCAG) и 519r (ATTACCGCGGCKGCTGG).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В среднем масса животных по группам к моменту выведения из эксперимента достоверно не отличалась и составляла в среднем 22 г. Как следует из полученных результатов (см. табл. 2), частота ФАК была наиболее высокой в группе животных, получавших как МНМ, так и L-тироксин. Было выявлено достоверное отличие по отношению ко всем исследуемым группам: по отношению к группам 1, 3, 4, 5 и 6 при $p < 0,001$, тогда как по отношению к группе 2, животные которой получали только МНМ, различия были зарегистрированы и значимы при $p < 0,01$. При этом группа контроля и группа, которая получала антигормональный препарат, не отличались достоверно по частоте возникновения ФАК. Интересно отметить, что группа, которая получала МНМ и ПТУ, также достоверно не отличалась по частоте ФАК от группы, получавшей только гормональный препарат. Причем у отдельных животных первой, контрольной группы, которые не получали никаких субстанций, также присутствовали единичные ФАК в слизистой оболочке прямой кишки (рис. 2). Такие же наблюдения были сделаны для остальных групп мышей. Напротив, в слизистой прямой кишки у ряда мышей из группы 3 в единичных случаях регистрировались множественные ФАК (рис. 3). Как правило, размер ФАК варьировал в пределах 0,1–0,3 мм.

Таблица 2 / Table 2

Частота фокусов aberrantных крипт (%) в слизистой прямой кишки
The frequency of foci of aberrant crypts (%) in rectal mucosa

Группы / Control	Вещества / Substances					
	Контроль / Control	МНМ / NMU	МНМ + L-тироксин / NMU + L- thyroxin	МНМ + ПТУ / NMU + PTU	L-тироксин / L-thyroxin	ПТУ / PTU
Первая / 1 st	3,1 ± 1,5	–	–	–	–	–
Вторая / 2 nd	–	25,3 ± 4,8	–	–	–	–
Третья / 3 rd	–	–	38,9 ± 3,6	–	–	–
Четвертая / 4 th	–	–	–	16,1 ± 2,5	–	–
Пятая / 5 th	–	–	–	–	12,9 ± 4,2	–
Шестая / 6 th	–	–	–	–	–	2,8 ± 0,9

Примечание. МНМ — метилнитрозомочевина; ПТУ — пропилтиоурацил.

Note. NMU – methylnitrosourea, PTU – propylthiouracyli.

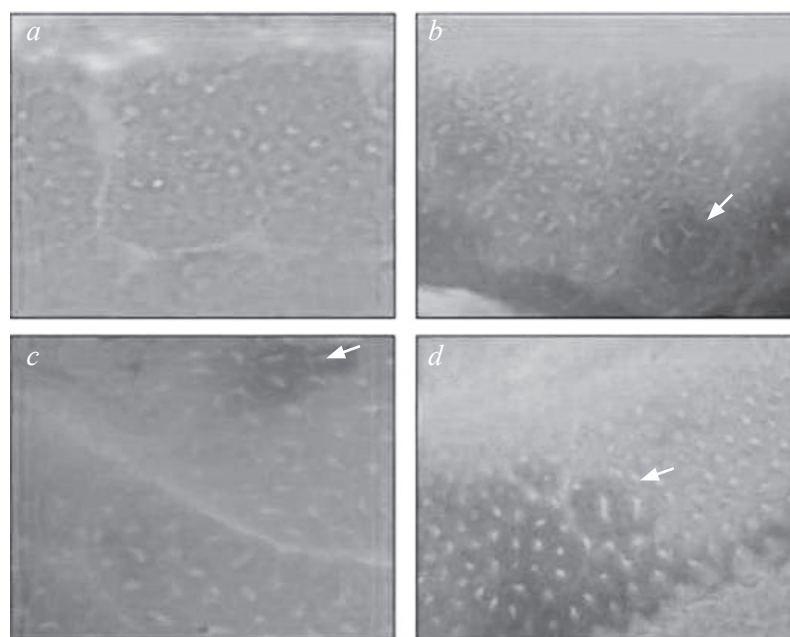


Рис. 2. Фокусы aberrantных крипт в слизистой прямой кишки: *a* – нормальная слизистая; *b*, *c*, *d* – фокусы aberrantных крипт указаны стрелками. Увеличение ×400

Fig. 2. Foci of aberrant crypts in rectal mucosa: *a* – normal rectal mucosa; *b*, *c*, *d* – foci of aberrant crypts indicated by arrows. Magnification ×400



Рис. 3. Множественные фокусы aberrantных крипт в слизистой прямой кишки мыши, получавшей МНМ и L-тироксин. Увеличение ×400

Fig. 3. Multiple foci of aberrant crypts in rectal mucosa of mice administered to methylnitrosourea and L-thyroxin. Magnification ×400

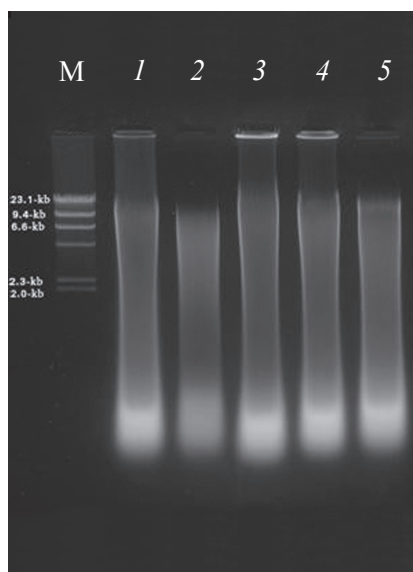


Рис. 4. Тотальная ДНК. М – маркер; 1 – группа 1; 2 – группа 2; 3 – группа 3; 4 – группа 4; 5 – группа 5

Fig. 4. Total DNA. M – marker; 1 – group 1; 2 – group 2; 3 – group 3; 4 – group 4; 5 – group 5

Результаты анализа микробиоты кишечника исследуемых животных показывают, что к началу эксперимента количественный показатель вида *Lactobacillus* соответствовал норме [19]. Поскольку группа 6 показала соответствие группе 1 как до начала эксперимента, так и по его окончании, то результаты не приведены. После воздействия субстанций в количественном распределении бактерий вида *Lactobacillus* (*Lactobacillus spp.*) в кишечнике мышей произошли определенные изменения (рис. 4, 5). Было зарегистрировано существенное количественное снижение *Lactobacillus spp.* в группах 2, 3 и 5 не только по отношению к контролю, но к остальным группам ($p < 0,05$). Интересно отметить, что между остальными группами по количественному изменению *Lactobacillus spp.* в кишечнике исследуемых мышей достоверных различий обнаружить не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что гипертиреозное состояние является фактором риска для развития опухоли молочной железы в эксперименте. Так, на мышах линии СЗН-А было выявлено, что при экспериментально измененном тиреозном статусе в группе самок, получавших L-тироксин, частота возникновения опухоли молочной железы была выше, а выживаемость ниже. При этом в группе животных, получавших пропилтиоурацил, частота возникновения опухоли молочной

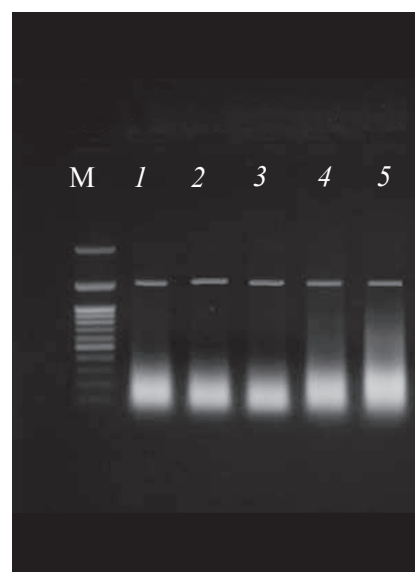


Рис. 5. Полимеразная цепная реакция. М – маркер; 1 – группа 1; 2 – группа 2; 3 – группа 3; 4 – группа 4; 5 – группа 5

Fig. 5. PCR. M – marker; 1 – group 1; 2 – group 2; 3 – group 3; 4 – group 4; 5 – group 5

железы была даже ниже, чем в контроле, хотя значимых различий обнаружено не было [4]. К настоящему времени уже получено достаточное количество убедительных данных, свидетельствующих, что гипертиреозное состояние служит фактором риска у женщин для развития не только рака молочной железы, но и яичника [1, 3, 5]. Поэтому гипертиреоз можно уверенно использовать как прогностический маркер в онкологической клинике [2]. В нашем исследовании было продемонстрировано, что при гипертиреозном статусе частота ФАК достоверно выше как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой мышей, получавших ПТУ (см. табл. 2). Это согласуется с данными проспективного исследования пациентов с гипертиреозом. У таких пациентов наблюдалась тенденция к более высокому риску возникновения колоректального рака по сравнению с пациентами, у которых уровень тиреозных гормонов был в норме. В данном исследовании было установлено, что гипотиреозное состояние обуславливает антиопухольный эффект [18]. Воздействие МНМ на фоне приема ПТУ существенно снижало частоту ФАК по сравнению, прежде всего, с группой, получавшей как МНМ, так и L-тироксин, где частота ФАК была наиболее высокой (см. результаты). Это говорит о защитном влиянии гипотиреозного состояния на частоту возникновения ФАК, а возможно, на возникновение впоследствии и колоректального рака. Несмотря на достиг-

нутые успехи в изучении механизмов, которые приводят к данной патологии, занимающей одно из ведущих мест в смертности от онкологических заболеваний, многое остается неясным. Обнаружены ассоциации между риском возникновения колоректального рака и определенными изменениями микробиома [35]. Так, например, при анализе микробиома у крыс с высокой частотой ФАК были выявлены достоверные изменения в составе микробиома по сравнению с крысами, у которых частота ФАК соответствовала референсным значениям. В группе с высокой частотой возникновения ФАК отмечалась тенденция к снижению *Lactobacillus spp.* [36]. Полученные в нашем исследовании результаты о снижении количества *Lactobacillus spp.*, которые являются представителями нормальной микрофлоры кишечника [6], могут указывать на защитное влияние *Lactobacillus spp.* по отношению к эпителию кишечника посредством метаболома [12]. Тогда как повышенный уровень тиреоидных гормонов и самой МНМ может обуславливать снижение количества, а возможно, и изменение качественного состава *Lactobacillus spp.* микробиома, как, впрочем, и других представителей нормальной микрофлоры и способствовать возникновению ФАК, а в дальнейшем и собственно колоректального рака [11]. В эксперименте было установлено, что использование пробиотика на основе *Lactobacillus spp.* (*Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus rhamnosus*) существенно снижало риск возникновения ФАК у мышей [22].

ВЫВОДЫ

Повышенная частота возникновения фокусов aberrантных крипт и уменьшение количества представителей нормальной микробиоты ассоциировано с гипертиреозом, который модулируется введением метилнитрозомочевины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власьева О.В., Глушаков Р.И., Соболев И.В., и др. Риск возникновения злокачественных новообразований у женщин с длительно протекающим гипертиреозом в анамнезе: ретроспективное рандомизированное исследование // Педиатр. – 2015. – Т. 6. – № 2. – С. 17–21. [Vlaseva OV, Glushakov RI, Sobolev IV, et al. The risk of malignancies in women with long flowing hyperthyroidism in history: a retrospective randomized study. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2015;6(2):17-21. (In Russ.)]. doi: 10.17816/PED6217-21.
2. Глушаков Р.И., Власьева О.В., Соболев И.В., и др. Тиреоидный статус как прогностический маркер в онкологии // Педиатр. – 2015. – Т. 6. – № 3. – С. 112–117. [Glushakov RI, Vlaseva OV, Sobolev IV, et al. Thyroid status as prognostic marker in oncology. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2015;6(3):112-117. (In Russ.)]. doi: 10.17816/PED63112-117.
3. Глушаков Р.И., Власьева О.В., Соболев И.В., и др. Стратегия фармакологической коррекции длительно протекающих негеномных эффектов тиреоидных гормонов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13. – № 51. – С. 48–49. [Glushakov RI, Vlas'eva OV, Sobolev IV, et al. Strategiya farmakologicheskoy korrektsii dlitel'no protekayushchikh negenomnykh effektivov tireoidnykh gormonov. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2015;13(51):48-49. (In Russ.)]
4. Глушаков Р.И., Тапильская Н.И., Прошин С.Н. Частота возникновения опухоли молочной железы при индуцированном гипертиреозе в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 8. – С. 212–215. [Glushakov RI, Tapil'skaya NI, Proshin SN. Chastota vzniknoveniya opukholi molochnoy zhelezy pri indutsirovannom gipertireoze v eksperimente. *Biull Eksp Biol Med*. 2013;156(8):212-215. (In Russ.)]
5. Глушаков Р.И., Дробленков А.В., Тапильская Н.И., Прошин С.Н. Морфологические изменения молочной железы и яичников у мышей с экспериментально измененным тиреоидным статусом // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – Т. 21. – № 1. – С. 81–87. [Glushakov RI, Drobленkov AV, Tapil'skaya NI, Proshin SN. Morphological changes in the breast gland and ovary of mice with experimentally induced hyperthyroid condition. *Scientific notes of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*. 2014;21(1):81-87. (In Russ.)]
6. Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., и др. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 3. – С. 317–335. [Golod NA, Loyko NG, Mulyukin AL, et al. Adaptatsiya molochnokislykh bakteriy k neblagopriyatnym dlya rosta usloviyam. *Mikrobiologiya*. 2009;78(3):317-335. (In Russ.)]
7. Ипатова М.Г., Шумилов П.В., Мухина Ю.Г., и др. Дисрегуляция иммунного ответа на индигенную микрофлору у детей и подростков с воспалительными заболеваниями кишечника // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2010. – Т. 89. – № 2. – С. 45–49. [Ipatova MG, Shumilov PV, Mukhina YG, et al. Disregulyatsiya immunnogo otveta na indigennuyu mikrofloru u detey i podrostkov s vospalitel'nymi zabollevaniya kishechnika. *Pediatriia*. 2010;89(2):45-49. (In Russ.)]

8. Курбанов Р.А., Лапкина Г.Я., Багатурия Г.О., и др. Влияние медикаментозно измененного тиреоидного статуса на возникновение фокусов aberrантных крипт в слизистой прямой кишки, индуцированных нитрозометилмочевинной // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – № 5. – С. 135. [Kurbanov RA, Lapkina GY, Bagaturiya GO, et al. Vliyanie medikamentozno izmenennogo tireoidnogo statusa na vzniknovenie fokusov aberrantnykh kript v slizistoy pryamoj kishki, indutsirovannykh nitrozometilmochevinoj. *Eksp Klin Farmakol.* 2018;81(5):135. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306.
9. Стадников А.А., Бухарин О.В. Гипоталамическая нейросекреция и структурно-функциональный гомеостаз про- и эукариот (морфологические основы реактивности, пластичности, регенерации). – Оренбург: ОрГМА, 2012. [Stadnikov AA, Bukharin OV. Gipotalamicheskaya neyrosekretsiya i strukturno-funktsional'nyy gomeostaz pro- i eukariot (morfolozicheskie osnovy reaktivnosti, plastichnosti, regeneratsii). Orenburg: OrGMA; 2012. (In Russ.)]
10. Akgul H, Tez M, Unal AE, et al. Echinococcus against cancer: why not? *Cancer.* 2003;98(9):1999-2000. doi: 10.1002/cncr.11752.
11. Anderson JC, Swede H, Rustagi T, et al. Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy. *Cancer Causes Control.* 2012;23(2):355-361. doi: 10.1007/s10552-011-9884-7.
12. Bolognani F, Rumney CJ, Pool-Zobel BL, Rowland IR. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. *Eur J Nutr.* 2001;40(6):293-300. doi: 10.1007/s394-001-8359-7.
13. Chen L, He Z, Qin L, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity. *PLoS One.* 2011;6(9):e24407. doi: 10.1371/journal.pone.0024407.
14. Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(1):1-15. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03834.x.
15. Ferrandez A, Samowitz W, DiSario JA, Burt RW. Phenotypic characteristics and risk of cancer development in hyperplastic polyposis: case series and literature review. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(10):2012-2018. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.30021.x.
16. Ferrandez A, DiSario JA. Colorectal cancer: screening and surveillance for high-risk individuals. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003;3(6):851-862. doi: 10.1586/14737140.3.6.851.
17. Freudenheim JL, LaMonte MJ. Periodontal Disease and Breast Cancer-Response. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(5):864. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0076.
18. Hellevik AI, Asvold BO, Bjoro T, et al. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):570-574. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0911.
19. Huang R, Tao X, Wan C, et al. *In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice. *J Dairy Sci.* 2015;98(9):5850-5861. doi: 10.3168/jds.2014-9153.
20. Hunter CA, Yu D, Gee M, et al. Cutting edge: systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis. *J Immunol.* 2001;166(10):5878-5881.
21. Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park).* 2006;20(3):269-276; discussion 285-266, 288-269.
22. Kaeid Sharaf L, Shukla G. Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG) in Conjunction with Celecoxib (selective COX-2 inhibitor) Modulated DMH-Induced Early Experimental Colon Carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 2018:1-10. doi: 10.1080/01635581.2018.1490783.
23. Klewicka E, Zdunczyk Z, Juskiwicz J, Klewicki R. Effects of Lactofermented Beetroot Juice Alone or with N-nitroso-N-methylurea on Selected Metabolic Parameters, Composition of the Microbiota Adhering to the Gut Epithelium and Antioxidant Status of Rats. *Nutrients.* 2015;7(7):5905-5915. doi: 10.3390/nu7075260.
24. Kurt A, Aygun AD, Sengul I, et al. Serum thyroid hormones levels are significantly decreased in septic neonates with poor outcome. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(4):e92-96. doi: 10.3275/7261.
25. Lauritano EC, Bilotta AL, Gabrielli M, et al. Association between hypothyroidism and small intestinal bacterial overgrowth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4180-4184. doi: 10.1210/jc.2007-0606.
26. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(10):661-672. doi: 10.1038/nrmicro3344.
27. Oliveira EC, Leite MS, Miranda JA, et al. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis.* 2001;22(5):737-740. doi: 10.1093/carcin/22.5.737.
28. Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:473964. doi: 10.1155/2011/473964.

29. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991;51(5):1564-1567.
30. Ribichini D, Fiorini G, Repaci A, et al. Tablet and oral liquid L-thyroxine formulation in the treatment of naive hypothyroid patients with *Helicobacter pylori* infection. *Endocrine.* 2017;57(3):394-401. doi: 10.1007/s12020-016-1167-3.
31. Roncucci L, Stamp D, Medline A, et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol.* 1991;22(3):287-294. doi: 10.1016/0046-8177(91)90163-J.
32. da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol.* 2007;38(8):1256-64. doi: 10.1016/j.humpath.2007.01.020.
33. Skorobogatikh II, Perunova NB, Kurlaev PP, Bukharin OV. Experimental study of combination of ciprofloxacin and oxytocin on formation of biofilms by opportunistic bacteria. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2010;(6):3-7.
34. Sulzyc-Bielicka V, Kolodziejczyk L, Jaczewska S, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with colorectal cancer. *Pol Przegl Chir.* 2012;84(7):348-351. doi: 10.2478/v10035-012-0058-4.
35. Ubillos L, Freire T, Berriel E, et al. Trypanosoma cruzi extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. *Int J Cancer.* 2016;138(7):1719-1731. doi: 10.1002/ijc.29910.
36. Xiao X, Long W, Huang T, et al. Differences between the Intestinal Lumen Microbiota of Aberrant Crypt Foci (ACF)-Bearing and Non-bearing Rats. *Dig Dis Sci.* 2018;63(11):2923-2929. doi: 10.1007/s10620-018-5180-7.

◆ Информация об авторах

Сергей Николаевич Прошин – д-р мед. наук, профессор, заведующий, кафедра фармакологии. ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: psnjsn@rambler.ru.

Руслан Абдулрашидович Курбанов – аспирант, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: ruslan_kra@mail.ru.

Святослав Игоревич Лоскутов – генеральный директор. ООО «НПО «БиоЭкоТех», Санкт-Петербург. E-mail: info@biocotech.ru.

Никита Николаевич Барсуков – лаборант, кафедра фармакологии. ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: nikich.spn@gmail.com.

Хаджимурад Омарович Алибеков – лаборант, кафедра фармакологии. ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: Knowledge-7780@mail.ru.

Дмитрий Александрович Качанов – лаборант, кафедра фармакологии. ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: kachanov.dima@yandex.ru.

Руслан Иванович Глушаков – канд. мед. наук, доцент, кафедра акушерства и гинекологии. ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

◆ Information about the authors

Sergei N. Proshin – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head, Department of Pharmacology. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: psnjsn@rambler.ru.

Ruslan A. Kurbanov – Postgraduate Student, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ruslan_kra@mail.ru.

Svyatoslav I. Loskutov – General Director. Limited Liability Company “Scientific production association “BioEcoTech”, Saint Petersburg, Russia. E-mail: info@biocotech.ru.

Nikita N. Barsukov – Staff, Department of Pharmacology. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: nikich.spn@gmail.com.

Hajimurad O. Alibekov – Staff, Department of Pharmacology. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: Knowledge-7780@mail.ru.

Dmitrii A. Kachanov – Staff, Department of Pharmacology. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: kachanov.dima@yandex.ru.

Ruslan I. Glushakov – MD, PhD, Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology. Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

◆ Информация об авторах

Георгий Отарович Багатурия – д-р мед. наук, профессор, заведующий, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург. E-mail: geobag@mail.ru.

◆ Information about the authors

Georgii O. Bagaturiya – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head, Department of Operative surgery and topographic anatomy. St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: geobag@mail.ru.